

This Page Is Inserted by IFW Operations
and is not a part of the Official Record

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images may include (but are not limited to):

- BLACK BORDERS
- TEXT CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- FADED TEXT
- ILLEGIBLE TEXT
- SKEWED/SLANTED IMAGES
- COLORED PHOTOS
- BLACK OR VERY BLACK AND WHITE DARK PHOTOS
- GRAY SCALE DOCUMENTS

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

**As rescanning documents *will not* correct images,
please do not report the images to the
Image Problem Mailbox.**



Государственный комитет
СССР
по делам изобретений
и открытий

О П И С А Н И Е ИЗОБРЕТЕНИЯ

К АВТОРСКОМУ СВИДЕТЕЛЬСТВУ

(61) Дополнительное к авт. свид-ву -

(22) Заявлено 04.12.79 (21) 2846902/30-15

с присоединением заявки № -

(23) Приоритет -

Опубликовано 07.01.83. Бюллетень № 1

Дата опубликования описания 07.01.83

(11) 986411

(51) М. Кл. 3

A 61 D 7/02

(53) УДК 66.099.4:
:591.463.1
(088.8)

(72) Авторы
изобретения

В.А. Наук и В.Г. Делеу

(71) Заявитель

Институт зоологии и физиологии АН Молдавской ССР

(54) СПОСОБ КОНСЕРВИРОВАНИЯ СПЕРМЫ ЖИВОТНЫХ

1

Изобретение относится к области искусственного осеменения сельскохозяйственных животных, в частности к способам консервирования спермы путем замораживания.

Известен способ консервирования спермы животных в пайетах, включающий разбавление спермы до половины конечной стадии разбавления защитной средой, содержащей 3% глицерина, охлаждение разбавленного семени до +4°C за 45-60 мин, вторичное разбавление семени защитной средой, содержащей 11% глицерина, расфасовку в соломинки, эквilibрацию и, наконец, замораживание его с последующим оттаиванием [1].

Недостатком этого способа является быстрое охлаждение семени до +4°C, отрицательное влияние высокой концентрации глицерина и длительного времени контакта с ним живчиков, которое проявляется в нарушении апикального края акросомы, разрушении устойчивости белково-липидных комплексов, а после замораживания и оттаивания семени выживаемость производителей снижается подвижность живчиков и абсолютный показатель их живучести.

2

Кроме того, при длительном контакте живчиков с глицерином имеет место утечка ряда ферментов, аминокислот, жирных кислот и функциональных групп из клеток сперматозоидов в плазму, что ведет к снижению биологической полноценности спермы.

Известен также способ консервирования спермы животных, включающий ее разбавление на первом этапе безглицериновой защитной средой, а на втором этапе - защитной средой с глицерином. При этом охлаждение проводят в течение 2 ч от 30 до 40°C, а замораживание проводят при -80°C [2].

Однако длительный контакт (более 30 мин) живчиков с глицерином приводит к нарушению устойчивости белково-липидных комплексов, морфологическим изменениям акросомы, выходу в плазму из живчиков ферментов.

В результате этого значительно снижается активность живчиков после оттаивания и составляет примерно 2-2,5 балла.

Целью изобретения является повышение жизнеспособности и биологической полноценности сперматозоидов после замораживания и оттаивания.

30

Цель достигается тем, что охлаждение спермы проводят от $+30$ до $+15^{\circ}\text{C}$ со скоростью $0,4-0,5^{\circ}\text{C}/\text{мин}$; от $+15$ до $+10^{\circ}\text{C}$ со скоростью $0,3-0,4^{\circ}\text{C}/\text{мин}$ и от $+10$ до $+4^{\circ}\text{C}$ со скоростью $0,2-0,3^{\circ}\text{C}/\text{мин}$, эквilibрацию с глицерином проводят при $+4-+5^{\circ}\text{C}$, течение 25-30 мин, а замораживание спермы проводят в парах жидкого азота при температуре $-120-140^{\circ}\text{C}$ в течение 8-8,5 мин.

Пример. Технология приготовления и консервирования семени сельскохозяйственных животных заключается в следующем. Вначале готовят защитную среду для разбавления семени. Для приготовления используют лактозу, фруктозу, рафинозу, сульфат магния, куриный желток и спермосан-3.

Разбавление семени вышеуказанной средой проводят на половину конечной степени разбавления: температура среды в момент разбавления $+30^{\circ}\text{C}$.

Баночки с разбавленной спермой помещают в ванночки с водой, температура которой $+30^{\circ}\text{C}$, и переносят в холодильную витрину с постоянной температурой $+4^{\circ}\text{C}$.

Охлаждение семени проводят трехступенчато: от $+30$ до $+15^{\circ}\text{C}$, от $+15$ до $+10^{\circ}\text{C}$ и от $+10$ до $+4^{\circ}\text{C}$. Охлаждение проводят путем добавления кусочков тающего льда или воды комнатной температуры.

При проведении опыта взято несколько режимов охлаждения и изучено их влияние на биохимические и физиологические показатели живчиков после замораживания и оттаивания семени (см табл. 1).

Установлено, что оптимальным режимом охлаждения является режим 3.

После охлаждения и выдержки семени при $+4^{\circ}\text{C}$ в течение 3,0-3,5 ч сперму разбавляют вторично той же защитной средой, но содержащей дополнительно 10 мл глицерина на 100 мл дистиллированной воды.

Температура среды в момент дополнительного разбавления равна $+4^{\circ}\text{C}$.

После второго разбавления семени лактозо-фруктозо-магниево-желточной средой, содержащей дополнительно глицерин, проводят расфасовку семени вручную или автоматически в полимерные соломинки объемом 0,5 мл, выдерживают их в витрине холодильника в течение 30 мин, после чего семя сразу замораживают.

Замораживание проводят в широкогорлом сосуде Дьюара, для чего соломинки раскладывают горизонтально на специальной рампе и помещают ее над парами жидкого азота на уровне 3-4 см от уровня азота при следующих температурах (см. табл. 2).

Время замораживания составляет 8 мин.

Температуру замораживания семени контролируют термпарой и регулируют расстоянием от уровня жидкого азота до рампы, на которой горизонтально были расположены соломинки с семенем.

Время выдержки семени в парах жидкого азота составляет 8 мин, после чего соломинки опускают в жидкий азот, где их карантруют в течение 30 дней, а затем переводят в спермобанк для дальнейшей отправки в хозяйства.

В результате контакта семени с глицерином в течение 30 мин улучшаются биохимические и физиологические показатели живчиков, в частности такие, как подвижность живчиков и продолжительность их жизни после оттаивания (см. табл. 3).

При предложенном режиме охлаждения достигается стабилизация морфологических, биохимических и физиологических показателей семени (см. табл. 4).

Данные показатели характеризуют семя до его замораживания.

В табл. 5 приведены качественные показатели семени быков-производителей после оттаивания.

Предложенный способ позволяет улучшить качество оттаянной спермы, повысить оплодотворяемость животных при снижении количества доз семени.

Таблица 1
Режимы охлаждения семени

Температурный и временной режимы	Режимы охлаждения семени, $^{\circ}\text{C}/\text{мин}$ [$^{\circ}\text{C}/\text{мин}$]			
	1	2	3	4
от $+30$ до $+15^{\circ}\text{C}$	0,2	0,3	0,4	0,5
от $+15$ до $+10^{\circ}\text{C}$	0,2 $^{\circ}\text{C}/\text{мин}$	0,2 $^{\circ}\text{C}/\text{мин}$	0,3 $^{\circ}\text{C}/\text{мин}$	0,4 $^{\circ}\text{C}/\text{мин}$
от $+10$ до $+4^{\circ}\text{C}$	0,1	0,1	0,2	0,3
Время охлаждения семени до $+4^{\circ}\text{C}$, мин (min)	160 min	135 min	85 min	63 min

cooling time

85
195

Т а б л и ц а 2
Влияние различных режимов замораживания семени быков-производителей
на подвижность и продолжительность жизни живчиков после оттаивания

Опыт, №	Температура заморажива- ния, °C <i>freezing t°C</i>	Показатель		
		подвижность живчиков по- сле оттаива- ния, баллы	продолжительность жизни живчиков по- сле оттаивания при 37°C, дни	абсолютный пока- затель живучести живчиков при +2-+4°C (S_a)
1	-120	4,6±0,21	8,8±0,2*	592,8±25,9*
2	-130	4,6±0,18	8,8±0,2*	593±24,5*
3	-140	4,6±0,21	9,0±0,3*	590±26,9
4	-160	4,2±0,35	7,6±0,5	446,4±17,1

* - различия статистически достоверны по отношению к прототипу.

*motility
of sperm*

time
glycerine
to
modify
training

Влияние времени выдержки семени после дополнительного разбавления семени синтетической средой, содержащей глицерин, на биохимические и физические показатели живчиков

Время выдержки разбавленного семени средой, содержащей глицерин, мин	Подвижность живчиков после оттаивания в зависимости от режимов охлаждения				Продолжительность жизни живчиков после оттаивания в зависимости от режимов охлаждения				Устойчивость белково-холестериновых комплексов в зависимости от времени выдержки, мкг холестерина на 10 ⁹ живчиков	
	2	3	4	контроль	2	3	4	контроль	3	контроль
1 ¹	4,3±0,3	4,3±0,1	4,2±0,09	4,25±0,1	7,4±0,2	7,7±0,2	7,0±0,3	7,0±0,2	166±6,8	146±7,2
5 ¹	4,2±0,1	4,25±0,07	4,0±0,08	-	7,0±0,3	7,3±0,3	7,0±0,25	-	148±7,8	-
10 ¹	4,25±0,12	4,25±0,1	4,15±0,2	-	7,0±0,2	7,3±0,3	6,9±0,25	-	150±8,1	-
15 ¹	4,2±0,15	4,25±0,2	4,2±0,1	-	7,2±0,2	7,3±0,2	7,2	18	155±7,7	-
20 ¹	4,25±0,12	4,35±0,1	4,3±0,08	-	7,5±0,25	7,5±0,2	7,3±0,3	-	167±8,0	-
25 ¹	4,3±0,15	4,5±0,12	4,35±0,14	-	7,4±0,3	7,8±0,2*	7,4±0,2	-	174±3,4*	-
30 ¹	4,4±0,12	4,6±0,1*	4,35±0,12	-	7,6±0,2	7,8±0,2*	7,4±0,3	-	178±5,2*	-
35 ¹	4,2±0,1	4,3±0,14	4,25±0,12	-	7,3±0,3	7,5±0,3	7,4±0,3	-	171±7,4	-
40 ¹	4,1±0,15	4,25±0,1	4,15±0,08	-	7,1±0,2	7,4±0,3	7,2±0,2	-	162±6,5	-

* - различия статистически достоверны по отношению к прототипу.

Т а б л и ц а 4

Морфологические, биохимические и физиологические показатели
семени до замораживания

Показатель	Предложенный способ охлаждения семени	Патент Великобритании № 1479648
Устойчивость белково-хлестериновых комплексов, мкг холестерина на 10 ⁵ живчиков	221±6,7*	203±5,8
Устойчивость белково-фосфолипидных комплексов, мкг фосфолипидов	2195±17,2**	2022±15,2
% живчиков с нормальной акросомой	75±1,5*	69,0±1,3
Активность глутамино-аспаргиновой трансаминазы в плазме семени	161±2,5	184±2,8**
Подвижность живчиков	8,0±0,08*	7,5±0,06

XX-P < 0,01;

X -P < 0,05.

Т а б л и ц а 5

Результаты испытания предложенного способа низкотемпературного замораживания с применением ЛФРМГЖ среды

Опыт, №	Показатель	Предлагаемый способ
1	Подвижность живчиков после оттаивания	4,75±0,09
2	Продолжительность жизни живчиков после оттаивания при 37°C, ч	8,8±0,34
3	Абсолютный показатель живучести живчиков после оттаивания при 37°C	30,2±1,2
4	Продолжительность жизни живчиков после оттаивания при +2—+4°C,	212,0±7,3
5	Абсолютный показатель живучести живчиков после оттаивания при +2—+4°C	602,6±15,4
6	Состояние акросомы живчиков: нормальной разрушенной	61,5±1,2 38,5±1,2
7	Устойчивость белково-холестериновых комплексов, мкг холестерина на 10 живчиков	185
8	Оплодотворяемость коров от первого осеменения	67,5

fertilization

Формула изобретения

Способ консервирования спермы животных, включающий ее разбавление безглицериновой защитной средой, охлаждение, повторное разбавление спер-

60 мы защитной средой, содержащий глицерин, эквilibрацию с глицерином и замораживание, отличающийся тем, что, с целью повышения жизнеспособности и биологической полноценности 65 сперматозоидов после замораживания

и оттаивания, охлаждение спермы проводят от +30 до +15°C со скоростью 0,4-0,5°C/мин, от +15 до +10°C со скоростью 0,3-0,4°C/мин и от +10 до +4°C со скоростью 0,2-0,3°C/мин, эквilibрацию с глицерином проводят при +4-+5°C в течение 25-30 мин, а замораживание спермы проводят в па-

рах жидкого азота при температуре -120--140°C в течение 8-8,5 мин.

Источники информации,

приняты во внимание при экспертизе

1. In French straw technique, 1976.
2. Патент Великобритании № 1479648, кл. А 01 N 1/202, 1977 (прототип).

Редактор О. Юркова Составитель А. Филиппова Корректор И. Ватрушкина
Техред С. Мигунова

Заказ 10363/6

Тираж 711

Подписное

ВНИИПИ Государственного комитета СССР

по делам изобретений и открытий

113035, Москва, Ж-35, Раушская наб., д. 4/5

Филиал ППП "Патент", г. Ужгород, ул. Проектная, 4